

ZÁRÓBESZÁMOLÓ

A krónikus légúti gyulladásos megbetegedések pathomechanizmusa című kutatási pályázat kidolgozása során a betegségcsoportba tartozó különböző kórállapotokkal foglalkoztunk és elsősorban nem-invazív mintavételi módszerekkel vizsgáltuk azok pathomechanizmusát. A betegségcsoportba tartozó kórképek közül elsősorban az asztmát, cisztás fibrózist, krónikus obstruktív tüdőbetegséget tanulmányoztuk. Ezek a megbetegedések jelen ismereteink szerint jelentős mértékben egymástól jól elhatárolódó pathomechanizmusúak, mindegyiket jellegzetes légúti gyulladásos folyamatok kísérik, melyeknek egyes részjelenségei (pl. makrofág aktiváció, fokozott légúti gyulladásos sejtszám) mindegyik kórállapotban előfordulnak. Ezen túlmenően vizsgáltuk tüdőtranszplantáción átesett személyek légúti mintáit is. A tüdőtranszplantált betegek a transzplantációt követően folyamatosan immunszuppresszív kezelés alatt állnak és állapotuk szoros követésére rendszeres kontrollvizsgálatok történnek. A legkörültekintőbb gyógyszeres beállítás ellenére is gyakran fordul elő komplikációként légúti fertőzés vagy akut kilökődési reakció ezekben a betegekben. Vizsgálataink ezen része elsősorban arra koncentrált, hogy megállapítsuk a non-invazív légúti mintavételezési módszerek diagnosztikai alkalmazhatóságát a két komplikáció differenciáldiagnosztikájában.

Konkrétan a tématerv központi kérdésfelvetéseit a következő kérdéskörök képezték:

1. A légutak oxidatív stresszének összefüggései krónikus légúti gyulladásos megbetegedésekben.
2. Az adenosin szerepe a terhelés által kiváltott légúti obstrukcióban.
3. A leukotriének szerepe asztmában és COPD-ben
4. A COPD alcsoportjainak eltérései a biomarkerek tükrében
5. A tüdőtranszplantált betegek akut kilökődési reakcióit kísérő légúti elváltozások biomarkereinek vizsgálata.

A tervezett vizsgálatok döntő többségét meg tudtuk valósítani. Az eredeti munkatervhez képest a korábbi részjelentésekben részletezett módon egyes esetekben azonban némiképpen el kellett térni annak pontos kidolgozásától, melynek hátterében különböző okok álltak. Ilyen ok volt pl. az, hogy nem sikerült megfelelő betegszámra bevonni beteget az adott betegcsoportból (ilyen csoport volt az aszpirin-szenzitív asztmások csoportja). Előfordult, hogy a tervezett vizsgáló módszert nem sikerült reprodukálhatóan beállítani (így a kilégzett levegő kondenzátumban történő interleukin 1 béta mérés), vagy a precíz tudományos kiértékeléshez nem sikerült megbízható adatokat kapnunk (ilyen volt a fiatalok friss zöldség fogyasztása és légúti gyulladást jellemző kilégzett nitrogén monoxid szint vizsgálata során a pontatlan adatszolgáltatás és a dohányzó fiatalok nagy száma).

Az altémák kidolgozása szorosan egymásra épült, egyes kérdések megválaszolása előtt metodikai fejlesztések, eljárás validálások történtek. E munka két kulcsfontosságú része a következő volt:

1. Feltételeztük, hogy a kilégzett levegő kondenzátumában mért mediátor szintek abszolút értékét befolyásolhatja az alkalmazott analitikai módszer. Ennek a feltételezésnek a vizsgálatára radio-immuno assay (RIA) és enzyme immuno assay (EIA) módszerekkel, ugyan abból az EBC mintából mért tromboxánB2 (TxB2) koncentrációkat hasonlítottunk össze. Az összehasonlítás során a két mérési módszer elemzésével derült ki, hogy a légúti folyadékfilmben nemcsak az eddigi feltételezéseknek megfelelő tromboxán A2 termék, a tromboxán B2 található, hanem ennek kíséretében tromboxán B3 is előfordul.

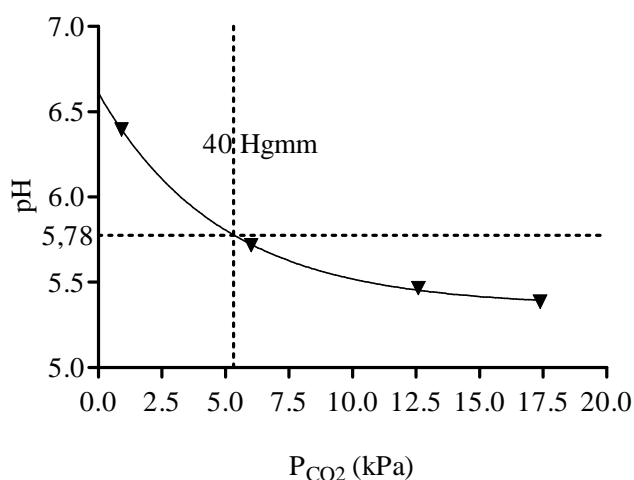
2. A kilégzett levegő kondenzátum biomarker tartalmának vizsgálataiban komoly nehézséget jelent a minta rendkívül „híg volta”, ami miatt sok esetben az alsó detekciós limit közelében lehet csak mérni a keresett biomarkert. E tekintetben könnyebb a mérési lehetőség a kondenzátum pH mérése esetében, mert ekkor nincs gond a detekciós limittel, a mérés könnyen kivitelezhető egy pH elektróddal, vagy vérgázanalizátorral, de becslésre akár egyszerű pH-papírt is használhatunk. A mérés egyszerű, olcsó, a szükséges eszközök a legtöbb laboratórium rendelkezésére állnak. A légúti pH számos celluláris folyamat szabályozásában szerepet játszik és több tanulmány kimutatta, hogy a légúti gyulladásos betegségekben számos esetben pH csökkenés történik, amelyet többen a légúti oxidatív stressz kísérőjének tartanak. Vizsgálataink egy része ezért irányult a kilégzett kondenzátum pH mérésére, hogy azzal tudjuk jellemezni az oxidatív stressz mértékét.

A kondenzátum pH-ja alapvetően a benne oldott CO_2 függvénye. A mintákban változó mértékben jelenlévő szén-dioxid zavaró hatását ki kell küszöbölnünk, hiszen a különböző légúti betegségek esetén a CO_2 tartalomtól független pH-ra vagyunk kíváncsiak.

A probléma megoldására az ERS/ATS irányelv a mintákon CO_2 -mentes inert gáz (Ar, He, N_2) 10 percen át történő átáramoltatását javasolja. Ennek célja, hogy egyrészt a gázátáramoltatással járó keverő hatással, másrészt az inert gáz mintába oldódásával a CO_2 -t kiszorítsa a mintákból. A minták pH értékének meghatározását ezt követően haladéktalanul el kell végezni, nehogy a légkörben jelenlévő CO_2 beleoldódjon a mintába. A módszer hátránya az, hogy nincs információ arról, hogy mennyi CO_2 maradt a kondenzátumban a buborékoltatás ellenére, ami pedig jelentős hatással van a kapott eredményekre.

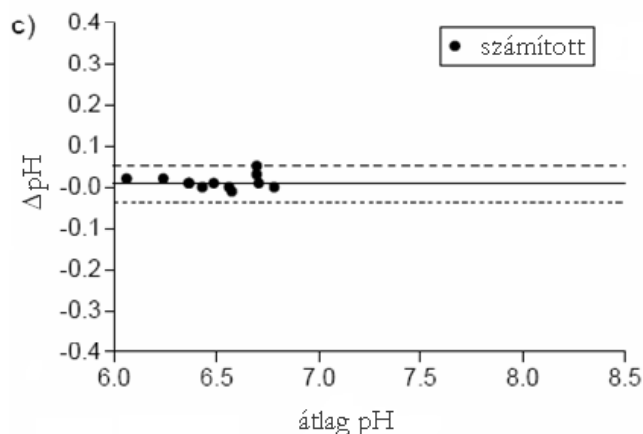
Munkacsoportunk ezért különös hangsúlyt fektetett a különböző gáz-standardizációs módszerek vizsgálatára, és egy olyan módszer kidolgozására, amely kiküszöböli ezt a zavaró tényezőt az EBC minták pH meghatározása során. Két eljárást dolgoztunk ki, az egyik az u.n. „ CO_2 mentes minták” pH mérése, extrapolációval történt, de elég nagy volt a mérési hiba. A másik, a 40 Hgmm-es PCO_2 -re normalizált pH meghatározás egy CO_2 buborékoltatás során felvett CO_2 -pH összefüggésre illesztett logaritmikus függvény segítségével.

Az ábrán egy személy reprezentatív görbéje látható kilégzett levegő kondenzátumának elemzéséből kapott értékek felhasználásával.



1. ábra A módszer reprodukálhatóságát vizsgálva azt találtuk, hogy a 40 Hgmm-es PCO_2 -re standardizált pH értékek mintegy hatszor reprodukálhatóbb eredményt adnak a másik két módszernél

A módszert felhasználtuk az EBC pH értékét befolyásoló tényezők vizsgálatához, így a környezeti páratartalom, hőmérséklet, a mintavevő eszköz hatásának vizsgálatához is. Bár



mindegyik tényező gyakorol kismértékű hatást a pH értékre, annak reprodukálhatósága még ilyen körülmények között is rendkívül jónak mondható más, a klinikumban is használt tesztekhez hasonlítva.

2. ábra Az EBC pH meghatározására alkalmazott módszerek reprodukálhatóságának vizsgálata Bland-Altman teszttel.

A pályázat kidolgozása során elért legfontosabbnak tartott eredményeinket a következőképpen foglalhatjuk össze.

1. Asztmás betegek kilégtett levegő kondenzátumában (EBC) terhelés hatására az adenosin koncentráció szignifikánsan nőtt és az EBC-ADO szint százalékos változása összefüggést mutatott a légúti bronchospasmus mértékével. Az adenosin koncentrációja nem változott metakolin inhaláció indukálta, >20% FEV1 csökkenést követően, jelezve, hogy a légúti simaizomzat nem-specifikus provokálószer hatására kialakuló konstriktója önmagában nem vezet a légúti adenosin koncentráció növekedéséhez. Az adenosin bronchokonstriktor hatása miatt emelkedett koncentrációban való megjelenése felelős lehet – legalábbis részben- a terhelés által kiváltott hörgőszűkület kialakulásáért. E szerepét részben közvetlenül a légúti simaizomsejteken hatva töltheti be, másrészt viszont facilitálhatja leukotrién felszabadulást. Az adenosin felszabadulás számos kísérleti modellben vált ki leukotrién szint emelkedést, a terhelés-indukált bronchospazmusban pedig több bizonyíték is utal arra, hogy a ciszteinil leukotriéneknek szerepük van a pathomechanizmusban. Vizsgáltuk a kórfolyamatban a leukotriének szerepét is és sikerült kimutatnunk, hogy a terhelés hatására egészségesekben és asztmásokban egyaránt történik légúti ciszteinil leukotrién koncentrációemelkedés, ennek mértéke azonban a terhelés-indukált bronchospazmusban nagyobb, és a spazmus mértékével valamint a légúti gyulladás indirekt markerével, a kilégtett nitrogén monoxid koncentrációval arányos. Mindezek alapján érdemesnek látszik a továbbiakban a purinerg és a leukotriének által mediált jelátviteli utak interakciójával foglalkozni.

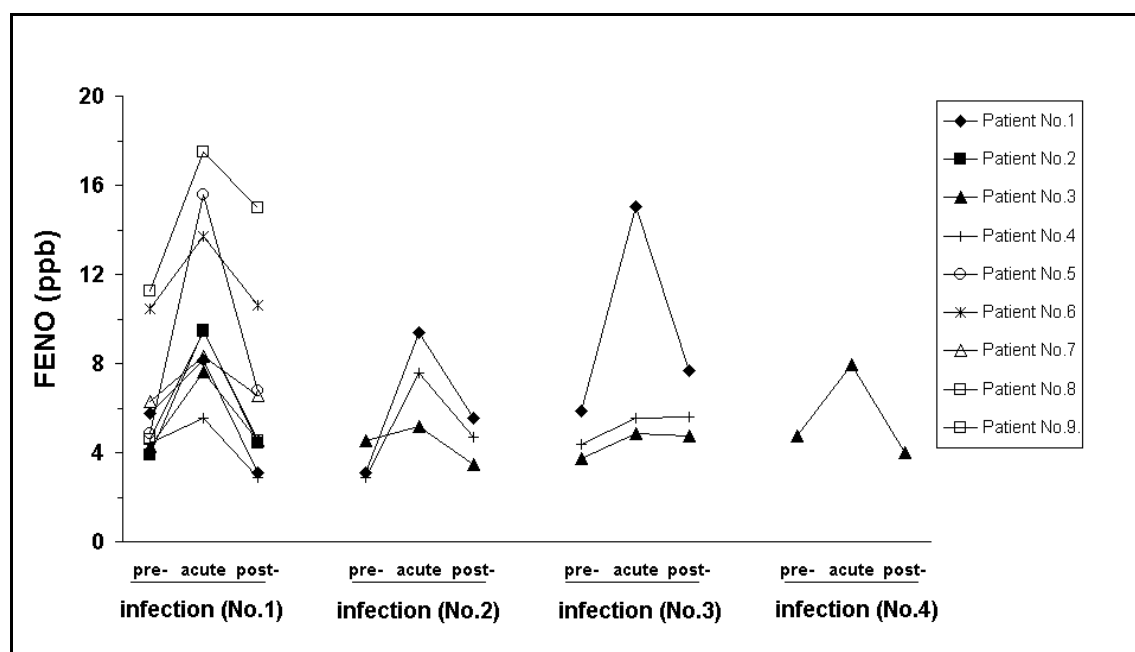
A kilégtett adenosin koncentrációra hatást gyakorol a felső légutak megbetegedése, így allergiás rhinitiszben a emelkedett koncentrációban jelenik meg ez a mediator a kilégtett levegőben. Forrásként vagy a felső légutakból lesodródó adenosin molekulák vagy a felső légutak megbetegedését kísérően kialakuló szubklinikus alsó légúti elváltozások merülnek fel, a mintavételezési technika azonban a két lehetőség szétválasztását nem teszi lehetővé.

A purinerg metabolitok közül a többi is igazolható a légúti mintákban, így kimutattunk ATP-t is egészségesekben és különböző légúti megbetegedésekben szenvedő betegekben egyaránt, de nem találtunk szignifikáns különbséget a különböző betegcsoportokban.

2. Több különböző betegcsoport kilégtett nitrogén monoxid koncentrációját vizsgálva kimutattuk, hogy a dohányos asztmásokban a nem dohányos asztmásokhoz képest lényegesen alacsonyabb a kilégtett NO szint, amihez emelkedett hidrogén peroxid koncentráció társul,

jelezve, hogy a sejtes gyulladás jellege eltér a két betegcsoportban. COPD-s betegekben, akiknek átlagosan az egészségesekével azonos a kilégzett NO koncentrációja, állapotuk akut romlásakor (exacerbációk alatt) a kilégzett NO koncentrációban mért emelkedés mértéke arányos a betegeknek a szteroidokkal szembeni válaszkészségre (a kezelés hatására elért légzésfunkciós javulással). Bár direkt módon nem tudtuk mérni ezekben az esetekben a sejtes gyulladás eozinofiles vagy neutrofiles jellegét, az idevonatkozó irodalom egybehangzóan azt mutatja, hogy az eozinofiles gyulladás jelzőszámaként kell értelmezni az NO szint emelkedést. Vizsgálataink eredményei felvetik a módszer ilyen irányba történő klinikai alkalmazhatóságának lehetőségét.

A harmadik vizsgálati ágban kimutattuk, hogy tüdőtranszplantált betegekben a kilégzett NO szint emelkedése kíséri a fertőzések kialakulását. Ez felhívja a figyelmet arra, hogy ha hasonló emelkedés lép fel akut kilökődési reakciók során is (melyre irodalmi adatok vannak), akkor ez a biomarker szint változás, differenciáldiagnosztikai célra nem alkalmas, de az NO szint emelkedése felhívja a figyelmet a fertőzés vagy rejekció megjelenésére, így a klinikusnak módjában áll további vizsgálatok elvégzésére (általában invazív bronchoszkópia) a diagnózis megerősítéséhez.



3. ábra Tüdőtranszplantált betegekben a kilégzett NO szint (FENO) változása stabil állapotban (pre-), infekció felléptekor (acute) és ezt követően a kezelés végén észlelt javult állapotukban (post). Egy-egy betegnél különböző számú infekciós epizód volt detektálható a longitudinális követés kb. 18 hónapja során.

Összefoglalva, kutatási projektünk kidolgozása közelebb vitt a vizsgált légúti megbetegedések pathomechanizmusának megértéséhez, valamint információkat adott a különböző vizsgáló módszereknek egyes kórképekben történő klinikai alkalmazhatóságához.